Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
im Radiologie-Zentrum
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. E. H. Graul

Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Metabolisierung und Aktivierung von Cyclophosphamid durch Organe der Ratte unter den Bedingungen der In-Vitro-Inkubation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Leendert A. van Alphen
aus Bandung (Ned. Ind.)

Marburg/Lahn 1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0032

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
im Radiologie-Zentrum
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. E. H. Graul

Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Metabolisierung und Aktivierung von Cyclophosphamid durch Organe der Ratte unter den Bedingungen der In-Vitro-Inkubation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Leendert A. van Alphen
aus Bandung (Ned. Ind.)

Marburg/Lahn 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn am 23. November 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. agr. E. Schaumlöffel
Correferent: Prof. Dr. med. dent. H. Schnell

Meiner lieben Frau Karin Anna in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T

		Seite
I.	Einleitung und Problemstellung	1
II.	Material und Methoden	7
1.	Radioaktiv markiertes Endoxan	7
2.	Aufbereitung von Organmaterial für Inkubationsversuche	7
3.	Durchführung der Inkubationsversuche	9
4.	Vakuumdialyse	10
5.	Bestimmung der Abbaurate des Endoxans zu Stoffwechselendprodukten (^3H_2O)	10
6.	Radiochromatographie	11
7.	Radioaktivitätsbestimmung	12
8.	Quantitative und qualitative Bestimmung von alkylierenden Metaboliten des Endoxans	13
9.	Statistische Methoden	14
III.	Ergebnisse	16
1.	Untersuchungen über die Stabilität von ^3H-Endoxan unter den Bedingungen der in vitro-Inkubation	17
2.	Untersuchungen über die Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan bei der Inkubation mit Organschnitten und -homogenaten der Ratte	18
3.	Inkubation von Knochenmark und Knochenmark-dialysat mit ^3H-Endoxan	20
4.	Inkubation von experimentellem Tumor-gewebe mit Endoxan	21
1.	Solides Yoshida-Sarkom der Ratte	21
2.	Ehrlich-Ascites der Maus	22
5.	Inkubation von Vollblut, Serum und Erythrozyten mit Endoxan	23
6.	Inkubation von Organextrakten mit Endoxan	25
7.	Inkubation von biologisch intaktem bzw. inaktiviertem Material mit Endoxan	26
8.	Untersuchungen über die Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan durch anorganische Katalysatoren	28

		Seite
IV.	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse und Diskussion	30
V.	Zusammenfassung	37
VI.	Tabellen	40
VII.	Literaturverzeichnis	
	Anhang	

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Maligne Tumoren werden vorwiegend operativ und/oder radiologisch behandelt. Eine Chemotherapie erfolgt meist in Kombination mit Operation und/oder nach Bestrahlung sowie bei chirurgisch und radiologisch austherapierten Fällen (12)

In der Chemotherapie maligner Tumoren finden heute Zytostatika der folgenden Gruppen Anwendung.

1. Alkylierende Substanzen. Sie werden auch Radiomimetika genannt, da sie in ihren Wirkungen auf den Zellstoffwechsel und die Proliferation Bestrahlungseffekten in etwa gleich zu setzen sind. Zu dieser Gruppe gehören u.a. Chlorambucil, Tetramin, Thio-TEPA, Cyclophosphamid und Derivate, Busulvan, Trenimon (12, 25).

2. Antimetabolite. Die Wirkung dieser Substanzen beruht auf konkurrierenden Verdrängungsreaktionen bei der Synthese von Nukleinsäuren. Zu dieser Gruppe rechnet man: Folsäureantagonisten, Purinantagonisten und einen Uracil-antagonisten (7).

3. Mitosehemmstoffe (Synchronisatoren). Sie bewirken eine Mitosehemmung in der Metaphase, was sich besonders bei schnell proliferierenden Geweben auswirkt. Hierzu zählt man u.a. Colchistin, Vinblastin, Vincristin, Arsenit (7).

4. Enzyme. l-Asparaginase reduziert den Gewebsspiegel an Asparagin. Da diese Aminosäure für leukämische Zellen essentiell ist, resultiert aus ihrem Mangel in der malignen Zelle eine Störung im Ablauf der biologischen Prozesse (41).

5. Hormone. Durch ihre spezielle Beeinflussung des Zellstoff-wechsels können sie auch schädigend auf die Tumorzelle ein-wirken. Zu diesen Stoffen rechnet man u. a. Glukokortikoide, Oestrogene und Androgene (41).

In der Gruppe der alkylierenden Substanzen stellt Cyclophosphamid (Endoxan (R), Astawerke AG, Brackwede (Westf.) N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N', O-propylenphosphorsäureester-diamid) auf Grund vergleichsweise geringer Nebenwirkungen und damit entsprechend therapeutischer Breite ein Mittel der Wahl in der Chemotherapie maligner Tumore dar (28) (vergl. Abb. 1).

Es wurde 1959 von ARNOLD und BOURSEAUX als ein Derivat des Nor-N-Lost synthetisiert.

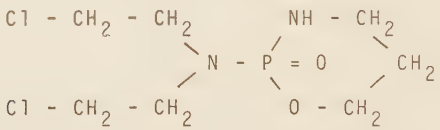

Abb. 1: Strukturformel von Endoxan.

Wie alle alkylierenden Zytostatika hemmt auch Endoxan die Zell-Proliferation kritischer Gewebe, wie z.B. Knochenmark, Haarbälge, Gonaden, Dünndarmepithel, foetales Gewebe und Neoplasmen. Die biologische Wirkung kann auf die Alkylierungsreaktion der Stickstoff-Lost-Gruppe zurückgeführt werden. HOHORST (6, 7) konnte, wie auch GRUNICKE (19) eine Glykolysehemmung im Jensen - Sarkom der Ratte nachweisen. BROOKS und LAWLEY (23, 24) fanden eine Alkylierung am N(7)-Atom des Guanins und führten die Mitosehemmung auf Cross-linking-Reaktionen des bi-funktionellen Alkylans an der Doppelhelix der DNS zurück. PALME, LISS, WIEBEL und KLINKE (22, 26, 27, 29, 30, 31 und 39) fanden bei mittleren Endoxandosen (10 mg/kg KGw) eine Verlängerung der prämitotischen Ruhephase (G_2-Phase), bei höheren Dosen (20 mg/kg KGw) dagegen einen Wirkungseintritt in der Synthesephase mit einer Blockierung der Mitose, jedoch nicht der DNS-Synthese. Nach GRUNICKE (44) hemmen alkylierende Zytostatika die Biosynthese von NAD und beschleunigen dessen Abbau. Dies verursacht eine Hemmung sowohl der

Glykolyse als auch pyridin-nukleotid-abhängiger Reaktionen. Der zytostatische Effekt tritt aber bereits bei Konzentrationen alkylierender Zytostatika auf, die den NAD-Spiegel noch unbeeinflußt lassen. Der Autor führt die Ursachen des zytostatischen Effektes vielmehr auf die Hemmung eines im Anschluß an die DNS-Synthese stattfindenden Umbauprozesses des Nukleoproteins zurück.

Die Befunde von WHEELER und ALEXANDER (39) stützen die Hypothese, nach der alkykierende Zytostatika eine am Übergang von der S- in die G_2-Phase beteiligte enzymatische Reaktion blockieren. Es wurde eine verstärkte Bindung von chromosomalem Protein an der DNS in Gegenwart von alkylierenden Zytostatika festgestellt, was jedoch nur für den Tumor, nicht für Leber, Milz und Nieren gilt.

Auf Grund seiner chemischen Konstitution kann Endoxan selbst als weitgehend inaktiv bezeichnet werden. Die eigentliche Umwandung des energiereichen Moleküls in zytostatisch aktive Formen erfolgt in vivo durch biochemische Prozesse, die die Basizität des zentralen N-Atoms herabsetzen und durch Abspaltung der Cl-Ionen eine alkylierende Reaktion ermöglichen. Nach BROCK u.HOHORST (2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15) wird Endoxan vor allem durch mikrosomale Enzymsysteme der Leber von der "Transportform" in die "Wirkform" umgewandelt. Dieser Aktivierungsprozeß, der durch Gabe von Phenobarbital verstärkt werden kann (26, 32), wird erklärt durch eine oxydative Dealkylierung am ringständigen N-Atom bei Anwesenheit von $NADPH_2$ und Sauerstoff. Die eigentliche zytostatische Aktivität wird von den Autoren zwei Metaboliten zugeschrieben, die in einem polaren Chromatographiesystem nach ihren R_f-Werten charakterisiert werden können und die im Vergleich zum Endoxan selbst einen mehr polaren Charakter zeigen (20).

Im Serum und im Urin von Ratten nach i.v. und i.p. Applikation von Endoxan konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei diesen alkylierenden Metaboliten nicht um Nor-N-Lost handelt, sondern um Produkte, bei denen der Phosphamidring nicht abgespalten ist (20, 33).

SCHAUMLÖFFEL u. Mitarbeiter (Publikation in Vorbereitung) konnten in Untersuchungen an der Ratte bei Doppelmarkierung des Endoxans mit Tritium in der Lostgruppe und ^{14}C im Phosphamidring zeigen, daß die in Organextrakten und Ausscheidungen nachweisbaren mehr als 10 Metabolite sich nicht auf eine extracyclische N-P-Spaltung zurückführen lassen und daß Nor-Lost nur in vernachlässigbaren Konzentrationen auftritt.

Nach SONNEBORN (37) handelt es sich bei dem für die biologische Wirkung als verantwortlich angesehenen Metaboliten um N, N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(2-carboxyäthyl)-phosphorsäurediamidester, der in seiner Struktur Ähnlichkeit besitzt mit N, N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-aminopropyl)-phosphorsäureamidester, einem ringoffenen Endoxan-Derivat, das von ARNOLDS (1) synthetisiert wurde. Von amerikanischen Arbeitsgruppen wurde nach Isolierung dieses Metaboliten aus dem Urin verschiedener Tierspezies und Strukturaufklärung die von SONNEBORN aufgezeigte Strukturformel bestätigt (45, 46). Diese Autoren klärten ebenfalls die Struktur einiger weiterer hydrophiler und eines lipophilen Metaboliten auf, denen jedoch keine biologische Aktivität bzw. alkylierende Potenz zugeschrieben wird. Nach Untersuchungen von SCHAUMLÖFFEL (17, 34, 35, 36) finden sich unter den Metaboliten des Endoxan auch direkt alkylierende Substanzen, die einen stärker unpolaren Charakter aufweisen als Endoxan selbst. Nach HOHORST (persönliche Mitteilung) handelt es sich bei den als biologisch aktiv angesehenen Metaboliten um ein ringoffenes oxydatives Abbauprodukt des Endoxans mit

einer endständigen Aldehyd-Gruppe.

Die von BROCK und HOHORST (2,3,4, 5, 8, 10, 11, 13, 14,15) erhobenen Befunde, daß die Metabolisierung des Endoxans zu biologisch aktiven Produkten vornehmlich in der Leber und in vergleichsweise sehr geringem Ausmaß auch in Lunge und Niere erfolgen soll, räumen der Leber eine zentrale Stellung in der Metabolisierung bzw. Aktivierung des Endoxans ein. Hiernach muß ein Transport der Wirkform bzw. der Wirkformen des Endoxans nach ihrer Entstehung in der Leber auf dem Blutweg in die kritischen Organe und in das eigentliche Erfolgsorgan, den malignen Tumor, erfolgen. Dies setzt einmal eine hohe spezifische Konzentration dieser Aktivierungsprodukte im Blut voraus, da vermutlich auf Grund des aktiven Transportes dieser elektrophilen Substanzen wirksame Konzentrationen in der Tumorzelle erzielt werden können. Diese zytostatisch aktiven Metabolite müßten damit einen hohen Grad an chemischer Stabilität sowie entsprechend lange biologische Halbwertszeiten besitzen.

Aus tierexperimentellen Untersuchungen von SCHAUMLÖFFEL (16, 18, 40) geht hervor, daß in den kritischen ersten Stunden nach Applikation einer Stoßtherapie gleiche zeitliche Maxima an Endoxan und Metaboliten in den analysierten Organen und auch im Tumor auftreten. Hierbei zeigen sich deutliche Anreicherungsfaktoren in den Organen gegenüber dem Blut. Die als zytostatisch aktiv angesehenen Metabolite unterliegen nach diesen Untersuchungen einer ausgesprochen raschen Elimination über die Nieren. Da im Gegensatz zu den elektrophilen Metaboliten Endoxan vermutlich passiv in die Zelle permeiert und dort relativ hohe initiale Konzentrationen erreicht, stellte sich uns die Frage, ob nicht auch andere Organe und Gewebe des Organismus in der Lage sind, Endoxan zu aktivieren und zu metabolisieren, wobei die unterschiedlichen Raten im Vergleich

zur Stoffwechselleistung der Leber besonders interessierten. Wir untersuchten daher mit Hilfe empfindlicher isotopentechnischer Methoden in in vitro-Inkubationsversuchen mit Schnitten und Homogenaten verschiedener Organe und experimenteller Tumoren der Ratte die Aktivierungs- und Umsatzraten von Endoxan.

Die von BROCK und HOHORST (10, 21) nachgewiesene hohe Stoffwechselleistung der Leber bezüglich der Endoxan-Aktivierung basiert ebenfalls auf in vitro-Inkubationsversuchen. Die Autoren bestimmten in den jeweiligen Inkubationslösungen die molare Konzentration an direkt alkylierenden Metaboliten des Endoxan durch kolorimetrische Analyse über die Farbreaktion dieser Substanzen mit 4-(γ-Nitrobenzyl)-Pyridin (NBP-Test). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 0,2 $/_{ug}$ Endoxan-äquimolarer Metabolite und ist damit relativ unempfindlich. Hierdurch wird in Inkubationsversuchen der Einsatz relativ hoher, d.h. unphysiologischer Konzentrationen an Endoxan erforderlich. Für die Durchführung unserer Untersuchungen stand uns Endoxan zur Verfügung, das mit Tritium markiert war und eine hohe spezifische Radioaktivität aufwies. Die untere Nachweisgrenze für Endoxan bzw. äquimolare Metabolite lag bei diesen isotopentechnischen Untersuchungen bei $5 \cdot 10^{-4}$ $/_{ug}$. Da Endoxan in vivo nicht nur in biologisch aktive und inaktive Metabolite umgewandelt wird, sondern auch einem teilweisen oder gesamten Abbau zu Stoffwechselendprodukten unterliegt, konnten wir einmal durch radiochromatographische Analysen den Anteil an gebildeten Metaboliten über ihre charakteristischen R_f-Werte ermitteln und zum andern über die Bildungsrate an ^3H_2O die Größe des Abbaus zu Stoffwechselendprodukten bestimmen. Neben diesen Untersuchungen bestimmten wir unter Anwendung des NBP-Testes qualitativ und quantitativ die Metabolite mit alkylierender Potenz. Über die von uns angewendete Versuchsanstellung und Methodik und die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird im folgenden berichtet.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Radioaktiv markiertes Endoxan

Für die radiochemische Analytik verwendeten wir Endoxan, das in der Lost-Gruppe mit Tritium markiert war (vergl. Abb. 2). Die Herstellung des tritiierten Produktes erfolgte im hiesigen Institut in einer 6stufigen Synthese (38). Die spezifische Aktivität des von uns verwendeten ^{3}H-Endoxan lag bei 580 uCi ^{3}H/mg bzw. 174 mCi/mM. Über den Zeitraum der Untersuchungen lag die radiochemische Reinheit des markierten Produktes zwischen 94 und 96 %. Diese radiochemische Reinheit wurde bei der Auswertung unserer chromatographischen Analysen entsprechend berücksichtigt. Nicht markiertes Endoxan, das wir in einigen Fällen zur Einstellung einer bestimmten spezifischen Aktivität oder bei speziellen Untersuchungen zur Bestimmung der alkylierenden Potenz mit dem NBP-Test einsetzten, wurde uns in dankenswerter Weise von den Astawerken zur Verfügung gestellt.

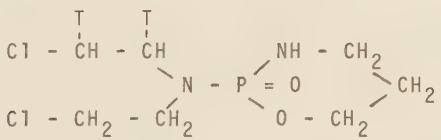

Abb. 2: Strukturformel des Tritium markierten Endoxans

II. 2. Aufbereitung von Organmaterial für Inkubationsversuche

Als Organspender wurden pathogenfreie weibliche Wistar-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 250 g verwandt. Die Tiere wurden nach Herzpunktion in Äthernarkose durch Dekapitieren getötet und entblutet und die für die jeweiligen Versuchsreihen interessierenden Organe Leber, Lunge, Milz, Nieren, Skelettmuskel (Oberschenkel), Knochen (Femur) sowie der Tumor entnommen. Die Organe wurden in Warburg-Ringer-Lösung (vergl. II. 3) gewaschen und wie frisch

hergestellte Organschnitte, Organhomogenate und Dialysate von Organextrakten bis zum schnellstmöglichen Versuchseinsatz bei + 4° C aufbewahrt.

Frisch entnommene Organe wurden mit einem Ultraturrax ohne Zusatz homogenisiert und aliquote Teile sofort für die jeweiligen Versuchsserien eingewogen. Zur Herstellung von Organschnitten wurden die mit Filterpapier angetrockneten Organe in Schnitte von 0,5 bis 1 mm Dicke zerteilt. Die Knochen wurden für die Untersuchungen mit einem Porzellanmörser zerkleinert. Knochenmark gewannen wir aus dem Röhrenknochen eines frisch geschlachteten Rindes. Nach sofortigem Homogenisieren wurde ein Teil des Knochenmarkhomogenats einer Vakuumdialyse (vergl. II.4) unterzogen.

An experimentellen Tumoren wurde solides Yoshida-Sarkom (Ratte) und Ehrlich-Ascites (Maus) eingesetzt. Nach subkutaner Injektion von 0,5 ml Yoshida-Ascites am Oberschenkel der Ratte töteten wir die Tiere nach Reifung der Tumore und schälten den Tumor sauber aus. Die Herstellung von Schnitten und Homogenaten erfolgte wie oben beschrieben. Nach intraperitonealer Applikation von 0,2 ml Ehrlich-Ascites wurden die Mäuse nach Reifung des Tumors getötet und die Ascites-Flüssigkeit abpunktiert. Ein Teil dieses Punktats wurde homogenisiert.

Aus dem durch Herzpunktion erhaltenen Vollblut wurde Serum gewonnen und wie gewaschene Erythrozyten für die Inkubationsversuche verwendet. Zum Einsatz gelangte ebenfalls Vollblut nach Hämolyse durch Gefriertechnik.

Zur Herstellung von Organextrakten wurden jeweils 3 g Organhomogenat 3 x mit 8 ml entsalztem Wasser extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden anschließend durch Vakuumdialyse bei + 4° C deproteinisiert. Nach Gefriertrocknung des Dialysats wurden die Rückstände mit 2,0 ml entsalztem Wasser aufgenommen.

II. 3. Durchführung der Inkubationsversuche

Die Inkubationen der verschiedenen Organproben mit Endoxan erfolgten in einer Warburg-Ringer-Lösung folgender Zusammensetzung:

5,0 ml Lösung A + 0,1 ml Lösung C

Lösung A: 6,921 g NaCl
+ 0,356 g KCl
+ 0,281 g $CaCl_2$
+ 0,169 g KH_2PO_4
+ 0,306 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
+ 2,093 g $NaHCO_3$
+ 2,0 g Glucose
+ 1000 ml entsalztes H_2O.

Die fertige Lösung wurde mit CO_2 durchgast.

Lösung B: 0,610 mg Nikotinsäureamid
+ 15,2 mg Glucose-6-Phosphat
+ 1,855 mg TPN
+ entsalztes Wasser ad 80,0 ml.

Lösung C: 1,0 mg Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 2,0 ml Lösung B

Die Konzentrationen der Warburg-Ringer-Lösung an ^3H-Endoxan wie auch die spezifische Aktivität der markierten Substanz variierte in den einzelnen Versuchsreihen nach der jeweiligen Fragestellung und wird bei Besprechung der Ergebnisse an entsprechender Stelle angegeben.

5,1 ml dieser auf + 4° C gekühlten Inkubationslösung wurden in 20 ml Erlenmeyerkolben einpipettiert; die jeweiligen Organproben wurden in diese Lösung eingewogen bzw. einpipettiert. Anschließend erfolgte über ca. 15 sec. eine Begasung mit Sauerstoff. Die fest verschlossenen Gefäße wurden dann über 90 Minuten in einer Warburg-Apparatur bei 37° C geschüttelt. Nach dieser Inkubationszeit wurden

die Gefäße im Eisbad abgeschreckt, die Inkubationslösung durch Vakuumdialyse deproteinisiert und der entsprechenden weiteren analytischen Bearbeitung zugeführt.

II. 4. Vakuumdialyse

Zur Deproteinisierung der Inkubationslösungen boten sich die saure Fällung ($HClO_4$) mit anschließender Neutralisation (KOH) oder die alkoholische Fällung an. Die bei diesen Fällungen unvermeidbare Volumenerhöhung und damit Verringerung der spezifischen Aktivität und den wahrscheinlichen Einfluß auf die chemische Konstitution von Metaboliten durch pH-Verschiebung und Oxidationswirkung umgingen wir durch Einsatz der Vakuumdialyse. Ein einseitig abgebundener Dialyseschlauch mit einem Durchmesser von 1 cm, der für Substanzen mit einem Mol-Gewicht < 1000 durchlässig war, wurde mit einem Glasrohr in der Bohrung eines Gummistopfens luftdicht fixiert. Der Stopfen dichtete ein 100 ml Vakuumgefäß mit Rundboden und oberen seitlichen Ansaugstutzen ab. Über ein angelegtes Vakuum (Wasserstrahlpumpe ca. 10^{-2} Torr) wurde die jeweilige Probenlösung mittels eines am Glasrohr angesetzten Schlauches in den Dialyseschlauch eingezogen. Nach Abklemmen des Zulaufschlauches und Erreichen des gewünschten Vakuums wurde der Vakuumschlauch ebenfalls abgeklemmt. Unter diesem angelegten Vakuum wurde anschließend über 10 Stunden bei + 4^{o} C dialysiert.

Entsprechende Untersuchungen hatten gezeigt, daß die Zusammensetzung des Vakuumdialysats weitgehend dem Spektrum der Ausgangslösung an Endoxan und Metaboliten entsprach.

II. 5. Bestimmung der Abbaurate des Endoxans zu Stoffwechselendprodukten ($^{3}H_2O$)

Durch Abspaltung der N-Lostgruppe und Verstoffwechselung beider Molekülgruppen wird Endoxan in seiner zytostatischen Wirkung inaktiviert. Über die Bestimmung des entstandenen Tritiumwassers in den jeweiligen Inkubationslösungen läßt

sich der prozentuale Anteil an abgebautem Endoxan bzw. N-Lost ermitteln. 0,1 ml der jeweiligen Inkubationslösungen wurden in parallelen Ansatz vor und nach Gefriertrocknung (Firma Leibold Modell GT 2) nach Versetzen mit 0,5 ml der quarternären Ammoniumbase Hyamin bis zur schlierenfreien komplexen Lösung bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Versetzen mit 15 ml Szintillationslösung (5 g PPO + 0,1 g POPOP + 200 ml Äthanol + Toluol ad 1000 ml) in einem Flüssigszintillationsspektrometer zur Messung gebracht.

Aus der Differenz der absoluten Aktivitäten (dpm) vor und nach Gefriertrocknung wurde der prozentuale Anteil an Tritiumwasser in den Inkubationslösungen berechnet.

II. 6. Radiochromatographie

30 µl der Dialysate der jeweiligen Inkubationslösungen wurden auf eine 5 x 20 cm Kieselgel-Kieselgur-Dünnschichtplatte (DC-Fertigplatten Kieselgel F 254, schnellaufend) aufgetragen. Chromatographiert wurde bei Zimmertemperatur in zwei Phasen mit zwei verschiedenen Laufmittelgemischen. Zur Auftrennung der vorwiegend hydrophilen, d.h. der mehr polaren Metabolite wurde mit dem Laufmittelgemisch I (Butanol:Methyläthylketon:H_2O:Methanol = 40:30:20:10 Volumenteile) über ca. 90 Minuten bis zu einer Laufmittelfront von etwa 8 cm chromatographiert. Die lipophilen, d.h. mehr unpolaren Metabolite und Endoxan selbst werden in diesem Laufmittelgemisch praktisch bis zur Laufmittelfront mitgeführt.
Nach Lufttrocknen der Platten schloß sich eine Chromatographie mit dem Laufmittelgemisch II (Aceton:Chloroform= 20:10 Volumenteile) bis zu einer Laufmittelfront von 15cm in etwa 30 Minuten an. In diesem Laufmittelsystem werden die unpolaren Metabolite und Endoxan aufgetrennt.

Die lufttrockenen Chromatogramme wurden in einem halbautomatischen Gerät eingespannt, mit dem die Schicht der Platten in 0,2 cm Breite quantitativ in Meßgläschen geschabt wurde. Nach Versetzen der Proben mit 10 ml spezieller Szintillationslösung (22 g Carb-o-sil + 5 g PPO + 0,1 g POPOP + 100 ml Methanol-Äthanol + Toluol ad 1000 ml) zur Gelstabilisierung, wurden die Proben mit einer Meßeffektivität für ^{3}H von ca. 20 % zur Aktivitätsbestimmung gebracht.
Aus den Ergebnissen der Aktivitätsbestimmungen der Meßproben eines Chromatogramms wurden die Summen der Radioaktivität der einzelnen Gipfel und deren prozentualer Anteil an der insgesamt aufgetragenen Radioaktivität berechnet.
Die Bestimmung der R_f-Werte erfolgte für beide Laufmittelsysteme getrennt, d.h. die Front des Laufmittelgemisches I (R_f 1,0) wurde als Auftragsstelle des Laufmittelgemisches II R_f 0,0) gewertet. Diese getrennte Auswertung der Chromatogramme in hydrophile und lipophile Substanzen führte für beide Gruppen zu R_f-Werten zwischen 0,0 und 1,0. Hierdurch war eine weitgehende Anpassung an in der Literatur aufgeführte Befunde möglich.

II. 7. Radioaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der ^{3}H-Aktivität erfolgte in einem 3-Kanal-Flüssigszintillationsspektrometer mit automatischer Quench-Korrektur und Datenausgabe in absoluter Aktivität (dpm) (Firma Packard Modell 3380). Das Gerät wurde auf alle in Frage kommenden Quench-Bereiche mit internem Standard (^{3}H-Toluol) über das Kanalverhältnis des externen Standards ($^{226}Ra/^{241}Am$) geeicht und diese Eichung während der Untersuchungen durch interne Standardmessung laufend kontrolliert. Das Gerät besaß für Tritium eine maximale Meßeffektivität von 52 %. Die Meßzeiten wurden so vorgewählt, daß die Standardabweichungen stets unter ± 3 % lagen.

II. 8. Quantitative und qualitative Bestimmung von alkylierenden Metaboliten des Endoxans

Die Bestimmung der direkt alkylierenden Substanzen in den Dialysaten der Inkubationslösungen erfolgte nach der von FRIEDMANN u. BOGER (42) beschriebenen Methodik, wobei wir abweichend von der Originalvorschrift bei einer anderen Wellenlänge photometrierten. Diese Methode beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung der Farbreaktion von 4-(γ-Nitrobenzyl)-pyridin mit alkylierenden Substanzen (NBP-Test). Da diese Methode im Vergleich zur Isotopentechnik relativ unempfindlich ist, waren wir gezwungen, aliquote Teile der Dialysate paralleler Versuchsansätze zu poolen und nach Gefriertrocknung in 3 ml entsalztem Wasser als Konzentrat aufzunehmen. Hierdurch konnte von jedem Versuchsansatz eine parallele quantitative Bestimmung der Gesamtheit der Endoxan-äquimolaren alkylierenden Metabolite durchgeführt werden und durch chromatographische Auftrennung nach Ansprühen mit NBP-Reagenz eine Zuordnung der alkylierenden Potenz zu den radiochromatographisch über ihre R_f-Werte charakterisierten Metabolite erfolgen.

Zur quantitativen NBP-Bestimmung wurden 1 ml Dialysat-Konzentrat in 30 ml Reagenzgläser mit Schliffstopfen einpipettiert und mit entsalztem Wasser auf 3 ml verdünnt. Im Eisbad erfolgte die Zugabe von 1 ml 0,025 m Acetatpuffer (pH 4,6)und von 0,4 ml einer 5-%igen Lösung von NBP in Aceton. Nach Durchmischen und 20minütigem Erhitzen im kochenden Wasserbad wurden nach Abkühlen im Eisbad 2 ml Aceton und 6 ml Essigsäureäthylester zugegeben. Nach Einpipettieren von 0,5 ml 0,25 n NaOH und Durchmischen wurden die Gläschen zur Trennung der beiden Phasen eine halbe Minute ruhiggestellt. Die überstehende organische Phase wurde in eine Küvette mit 2 cm Schichtdicke überführt und im Filterphotometer (Firma Zeiss-Elko II) mit Filter S 51(510 nm) die Extinktion ermittelt. Die photometrische Messung erfolgte genau 2 Minuten nach Zugabe der NaOH-Lösung. Die Berechnung

der Konzentration an alkylierenden Metaboliten in Mol-%-Endoxan erfolgte mit Hilfe einer mit NH-Lost (bis-(2 Chloräthyl)-amin-Hydrochlorid) aufgestellten Eichkurve, die im Bereich von 0,1 bis 2 µg NH-Lost der Extinktion direkt proportional verlief.

Zur qualitativen NBP-Bestimmung wurden 50 µl der Dialysat-Konzentrate, wie unter II.6. beschrieben, chromatographisch aufgetrennt. Die lufttrockenen Chromatogramme wurden mit einer 2,5%igen Lösung von NBP in Aceton besprüht und 10 Minuten bei 90° C getrocknet. Nach Besprühen mit einer 0,25 n NaOH-Lösung färbten sich Metabolite mit alkylierender Potenz blauviolett an. Für diese mit NBP positiv reagierenden Substanzen vermittelten wir die R_f-Werte und konnten so einige der im Radiochromatogramm nachgewiesenen Substanzen als alkylierende Metabolite des Endoxans identifizieren.

II. 9. Statistische Methoden

Da die Inkubationsversuche stets mit mehreren parallelen Ansätzen sowie mit Wiederholungen an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, erfolgt die Angabe der Ergebnisse in Mittelwerten ($\bar{x}$) mit der Standardabweichung des Einzelwertes (s).

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_1^2 - \frac{\left(\sum x_1\right)^2}{N}}{N-1}} \qquad \bar{x} = \frac{\sum x_1}{N}$$

Diese Fehlerberechnungen erfolgten für die Bildungsrate an Tritiumwasser, für die Metabolisierungsrate (Radiochromatographie) sowie für die aus diesen beiden Größen resultierende Gesamtumsatzrate. Die Metabolisierungsrate bezieht sich hierbei auf den chromatographisch nachgewiesenen Anteil an unverändertem Endoxan nach der Inkubation. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die chromatographisch nachgewiesenen prozentualen Anteile an Metaboliten ohne die Standardabweichung wiedergegeben. Da die quantitative NBP-Bestimmung aus dem Konzentrat der gepoolten

Dialysate der parallelen Inkubationsversuche durchgeführt wurde, stellen diese Werte den Mittelwert zweier Parallelbestimmungen dar; eine Fehlerberechnung konnte daher nicht durchgeführt werden.

Unterschiede zwischen den Mittelwerten von Organen bzw. von Organschnitten und -homogenaten wurden auf biologische Signifikanz mit Hilfe des inhomogenen t-Testes nach STUDENT überprüft.

III. Ergebnisse

Unsere Untersuchungen über die Möglichkeit einer Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan durch verschiedene Organe bzw. Gewebe der Ratte im in-vitro-Inkubationsversuch erlauben in ihren Ergebnissen Aussagen über

1. Abbau des Moleküls bzw. der eigentlich aktiven Stickstoff-Lostgruppe zu Stoffwechselendprodukten über die Bildungsrate an Tritiumwasser.
2. Die Größe der Metabolisierungsrate des eingesetzten Endoxans und die prozentualen Anteile der gebildeten und über ihre R_f-Werte nachweisbaren Metabolite durch Radiochromatographie.
3. Die Größe der Gesamtumsatzrate aus 1. und 2.
4. Die Zuordnung der alkylierenden Potenz zu entsprechenden radiochromatographisch nachgewiesenen Metaboliten durch chromatographischen NBP-Sprühtest.
5. Die Konzentration an direkt alkylierenden Metaboliten in den Dialysaten der Inkubationslösungen durch photometrische Analyse der NBP-Farbreaktion.

In der radiochromatographischen Analyse konnten über die jeweiligen Radioaktivitätsgipfel neben Endoxan zehn Metabolite über ihre charakteristischen R_f-Werte identifiziert werden. Endoxan findet sich im unpolaren Laufmittel II unter einem R_f-Wert von 0,4. Bei den im gleichen Laufmittelsystem mit einem R_f-Wert von 0,2 nachweisbaren Metaboliten handelt es sich vermutlich um Keto- bzw. Oxo-Endoxan, während die Struktur der unter den R_f-Werten 0,6 und 0,7 in diesem Laufmittelsystem auftretenden Metaboliten noch nicht geklärt ist. Der Metabolit mit dem R_f-Wert 0,7 zeigt positive NBP-Reaktion und gehört somit in die Gruppe der direkt alkylierenden Metabolite.

Im polaren Chromatographiesystem I finden sich unter den R_f-Werten 0,88 und 0,74 zwei direkt alkylierende Metabolite,

von denen der mit dem R_f-Wert 0,88 von BROCK u. HOHORST (20) als der eigentlich biologisch wirksame Metabolit angesehen wird und der in seiner Struktur als N,N-(Bis-[2-chloräthyl]) -O-(2-carboxy--äthyl)-phosphorsäurediamidester angesehen wird (37, 45, 46). Bei dem Metabolit mit dem R_f-Wert 0,74 scheint es sich um die desamidierte Form des Metaboliten R_f 0,88 zu handeln. NH-Lost ist in diesem Laufmittelsystem durch den R_f-Wert 0,6 charakterisiert. Die stark hydrophilen Metabolite mit den R_f-Werten 0,5 ; 0,35 und 0,2 sind in ihrer Struktur noch nicht aufgeklärt, zeigen jedoch keine positive NBP-Reaktion. Der Phosphamidring scheint jedoch bei diesen drei Metaboliten noch nicht abgespalten zu sein (35).

III. 1. Untersuchungen über die Stabilität von ^{3}H-Endoxan unter den Bedingungen der in vitro-Inkubation

In einer Versuchsreihe (n = 5) wurden 25 mg ^{3}H-Endoxan mit einer spezifischen Aktivität von 1,0 uCi ^{3}H/mg unter den normalen Versuchsbedingungen in 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung 90 Minuten bei 37° C inkubiert. Die in den Dialysaten dieser Inkubationslösungen durchgeführten Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse.

1. Menge an gebildetem Tritiumwasser: 2,26 ± 0,12 %
2. Metabolisierungsrate: 8,10 %
   (Chromatographisch wurden folgende Metabolite nachgewiesen: im polaren Laufmittelsystem I mit den R_f-Werten: 0,2(0,60%); 0,5(0,80%); 0,74(2,40%); 0,88(1,80%), im unpolaren Laufmittelsystem II mit den R_f-Werten: 0,4(91,90%; 0,6 - 0,7(2,50%)
   Metabolite mit direkt alkylierender Potenz sind unterstrichen.)
3. Gesamtumsatzrate: 10,36 %
4. Direkt alkylierende Metabolite: 2,25 Mol%

Diese Ergebnisse zeigen, daß Endoxan unter diesen Versuchsbedingungen einer geringen Metabolisierung unterliegt .
Die radiochemische Reinheit des von uns eingesetzten Endoxan-^{3}H lag im Untersuchungszeitraum zwischen 94 und 96 %.

Das bedeutet, daß bis zu max. 6 % der Radioaktivität bzw. der Gesamtkonzentration in Form von Radiolyseprodukten vorlagen. Die Metabolisierung von Endoxan unter unseren Versuchsbedingungen lag damit zwischen 2 und 3 %. Diese Umsatzrate einschließlich der Radiolyserate wurde bei allen Ergebnissen unserer Untersuchungen in Abzug gebracht. Da unter unseren Versuchsbedingungen auch die Radiolyseprodukte wahrscheinlich einer Metabolisierung unterlagen, es aber nicht möglich war, diese Umsätze quantitativ zu erfassen, verzichteten wir bei der Berechnung der prozentualen Anteile der nachgewiesenen Metabolite an der gesamt aufgetragenen Radioaktivität auf eine Korrektur. Die in den Tabellen über die Ergebnisse der chromatographischen Analysen aufgeführten Anteile der Metabolite sind also unter diesen Vorbehalten zu bewerten. Die nachgewiesene relativ hohe NPB-Aktivität läßt sich wahrscheinlich auf eine Verunreinigung des eingesetzten, nicht markierten Endoxan mit NH-Lost zurückführen, worauf andere Autoren bereits hingewiesen haben (21, 37). Diese Konzentration an alkylierenden Metaboliten wurde ebenfalls bei Auswertung der entsprechenden Untersuchungen mit dem NBP-Test durch Abzug berücksichtigt.

Bei der Inkubation von Organproben liefen in jeder Versuchsreihe Gefäße mit reiner Inkubationslösung unter Zusatz der jeweils in den Versuchen eingesetzten Konzentration an ^{3}H-Endoxan mit. Die hierbei ermittelten Anteile an $^{3}H_2O$, und NBP-aktiven Substanzen wurden als Blindwerte bei der Berechnung der Ergebnisse aus den Inkubationsversuchen mit Organproben entsprechend berücksichtigt.

III.2. Untersuchungen über die Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan bei der Inkubation mit Organschnitten und Homogenaten der Ratte

In 5 Versuchsreihen mit je 3 parallelen Ansätzen (n = 15) wurden 200 mg Homogenat bzw. Schnitte der Rattenorgane Leber, Lunge, Milz, Nieren, Skelettmuskel und Knochen (Splitter) über 90 Minuten bei 37° C inkubiert. An ^{3}H-Endoxan wurden der 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung 50 µg mit einer

spezifischen Aktivität von 580 uCi/mg zugesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen (^3H_2O-Bildungsrate, Metabolisierungs- und Gesamtumsatzrate sowie Anteile an direkt alkylierenden Metaboliten in Prozent bezogen auf das eingesetzte ^3H-Endoxan) sind in Tabelle 1 (s. Anhang) verzeichnet.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen geht hervor, daß die Homogenate aller analysierten Organe bzw. Gewebe sowie Leber- und Lungenschnitte in der Lage zu sein scheinen, unter den angewendeten Versuchsbedingungen Endoxan nicht nur zu metabolisieren und zu Stoffwechselendprodukten abzubauen, sondern auch zu aktivieren, d. h. in Metabolite mit alkylierender Potenz umzuwandeln. Die im Mittel bei 8 Mol% liegende Bildungsrate für Tritiumwasser ist relativ hoch. Die Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Organen als auch zwischen Homogenat und Schnitten gleicher Organe sind auf Grund der Streuungen der Einzelwerte als zufällig zu betrachten. Auch die radiochromatographisch nachgewiesene Metabolisierungsrate zeigt relativ hohe Werte. Die deutliche Tendenz einer höheren Metabolisierungsrate durch Organhomogenate im Vergleich zu Schnitten läßt sich jedoch auf Grund der starken Streuungen nur bei Milz, Niere und Muskel als biologisch signifikant erweisen ($p < 0{,}001$). Diese Tendenz spiegelt sich auch in den Ergebnissen bezogen auf die Gesamtumsatzrate wieder, wo die Unterschiede zwischen Schnitten und Homogenaten bei den Organen Milz, Nieren und Muskel biologisch signifikant sind ($p < 0{,}001$). Mit einer Gesamtumsatzrate von mehr als 20 % zeigt Nieren-Homogenat den höchsten Wert, während Milzschnitte mit etwa 6 % in der Gesamtumsatzrate am niedrigsten liegen. Mit etwa 10 Mol% liegen die direkt alkylierenden Metabolite in den Konzentraten der gepoolten Dialyselösungen aus den einzelnen Versuchsreihen sowohl bei Schnitten und Homogenaten als auch bei den einzelnen Organen in gleichen Größenordnungen. Bei einigen Organen liegen diese Werte allerdings um den Faktor 2 höher als dies aus den Ergebnissen der radiochromatographischen Analysen in Verbindung mit dem NBP-Sprühtest zu erwarten gewesen wäre.

In der radiochromatographischen Analyse (vergl.Tab.2,Anhang) fanden sich vorwiegend hydrophile Metabolite, die im polaren Laufmittelsystem I aufgetrennt wurden. Die höchsten prozentualen Anteile an der Gesamtkonzentration der Metabolite weisen neben dem R_f 0,5 die beiden direkt alkylierenden Metabolite R_f 0,88 und 0,74 auf. Die im unpolaren Laufmittelsystem II aufgetrennten Substanzen waren nur vereinzelt und mit geringen prozentualen Anteilen vertreten.

III.3. Inkubation von Knochenmark und Knochenmarkdialysat mit ^{3}H-Endoxan

Die hohen Metabolisierungs- bzw. Umsatzraten von Endoxan bei der Inkubation mit Knochensplittern (vergl. Tab. 1 u.2, Anhang) ließen die Frage nach der Beteiligung von Knochenmark an der Aktivierung bzw. Metabolisierung des Medikamentes offen. Um entsprechende Quantitäten an Knochenmark einsetzen zu können, setzten wir Mark von Rinderknochen in die entsprechenden Untersuchungen ein. In 5,1 ml Inkubationslösung wurden 250 mg homogenisiertes Knochenmark eingewogen bzw. 1,0 ml Vakuumdialysat von homogenisiertem Mark einpipettiert. Die Konzentrationen an ^{3}H-Endoxan in den jeweiligen Inkubationslösungen betrug 2 mg mit einer spezifischen Aktivität von 15 µCi ^{3}H/mg.
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind als Mittelwerte von zwei Versuchsansätzen mit je drei Parallelen in den Tabellen 1 (^3H_2O-Bildungsrate, Metabolisierungs- und Gesamtumsatzrate sowie alkylierende Metabolite in Mol%) und 3 (Radiochromatographie) zu entnehmen.

Die Metabolisierungs- und Umsatzraten wiesen zwischen Knochenmark und Knochenmark Dialysat deutliche Unterschiede auf. Die Menge an gebildetem Tritiumwasser war mit ca. 5 % im Dialysat gleich hoch wie im Homogenat. Die Metabolisierungsrate lag dagegen beim Knochenmark (10,18 %) auffallend hoch gegenüber diesem Wert beim Dialysat (0 %). Bei der Bestimmung der Konzentration an entstandenen Metaboliten mit alkylierender Potenz sind die Unterschiede zwischen Homogenat (9,23 %)

und für Dialysat (7,78 %) nur als zufällig zu werten. Im Radiochromatogramm (vergl.Tab.3) waren sowohl bei Knochenmark-Homogenat als auch bei -Dialysat die polaren Metabolite mit den R_f-Werten 0,74, 0,6, 0,35 und 0,2 und der unpolare Metabolit R_f 0,7 nachzuweisen. Nur beim Knochenmark-Homogenat trat der polare direkt alkylierende Metabolit mit dem R_f-Wert 0,88 und der unpolare Metabolit mit dem R_f-Wert 0,2 auf. Die polaren Metabolite mit den R_f-Werten 0,88, 0,74 und 0,6 sowie der unpolare Metabolit mit dem R_f-Wert 0,7 zeigten im NBP-Sprühtest im Chromatogramm des Konzentrats NBP-positive Reaktion.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß auch Knochenmark Endoxan zu metabolisieren und zu aktivieren vermag. Die hohen Umsatzraten, die mit Splittern des Rattenknochens erzielt wurden, konnten in diesem Versuch jedoch nicht erreicht werden. Ob diese Unterschiede Spezies bedingt sind oder ob die Aktivierung im Knochenmark tatsächlich niedriger angesetzt werden muß als in der Knochensubstanz selbst, kann nicht beurteilt werden.

III. 4. Inkubation von experimentellem Tumorgewebe mit Endoxan

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Versuche hatten gezeigt, daß nicht nur die eigentlichen Stoffwechselorgane in der Lage sind, Endoxan zu metabolisieren bzw. zu aktivieren. Wir bezogen daher auch Gewebe von experimentellen Tumoren in unsere Untersuchungen mit ein.

III.4.1. Solides Yoshida-Sarkom der Ratte

Bei Einsatz von je 300 mg Schnitten bzw. Homogenaten des reifen Yoshida-Sarkoms der Ratte lag die Konzentration an ^{3}H-Endoxan in der 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung bei 0,55 mg mit einer spezifischen Aktivität von 55 uCi ^{3}H/mg. Es wurden 5 Versuche mit je drei Parallelen durchgeführt.Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind den Tabellen 1 und 4 zu entnehmen.

In der Größe der Bildungsrate an ^3H_2O zeigte sich zwischen Homogenat und Schnitt kein Unterschied. Mit etwa 11 % lag der Abbau des Medikaments zu Stoffwechselendprodukten im Vergleich zu den übrigen analysierten Organen ausgesprochen hoch. Auch die Metabolisierungsraten zeigten mit etwa 9 % bei beiden Aufbereitungsarten des Tumors zur Inkubation keinen Unterschied und lagen ebenfalls auffällig hoch. Radiochromatographisch waren bei beiden Ansätzen die polaren Metabolite mit den R_f-Werten 0,88, 0,74, 0,35 und 0,2 und die unpolaren Metabolite mit den R_f-Werten 0,6 (Homogenat) und 0,7 (Schnitte) nachweisbar, wobei zwischen den prozentualen Anteilen der Metabolite an der Gesamtkonzentration zwischen Homogenaten und Schnitten kein Unterschied aufgezeigt werden konnte. Auffällig hoch war der Anteil des polaren Metaboliten mit dem R_f-Wert 0,35. Als alkylierende Metaboliten wurden die mit den R_f-Werten 0,88 und 0,74 im polaren System im NBP-Sprühtest identifiziert (vergl.Tab. 4, Anhang). Die bei Tumorschnitten und -homogenaten mit etwa 14 Mol% nachgewiesenen Konzentrationen an direkt alkylierenden Metaboliten im Konzentrat der Dialysate scheinen um den Faktor 2 höher zu liegen als dies nach den Ergebnissen der Radiochromatographie mit dem NBP-Sprühtest zu erwarten war.

III. 4. 2. Ehrlich-Ascites der Maus

Die Inkubationen erfolgten mit je 4 ml Ascites bzw. Ascites-Homogenat in 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung mit einer Konzentration an ^3H-Endoxan von 2 mg bei einer spezifischen Aktivität von 15 µCi ^3H/mg. Es wurden zwei Versuchsreihen mit je 5 Parallelen für Ascites und für Ascites-Homogenat durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 1 und 5 wiedergegeben.

Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Versuchsergebnissen konnte weder bei Ascites, noch bei Ascites-Homogenat in der 90-minütigen Inkubation mit ^3H-Endoxan eine Metabolisierung festgestellt werden.

Auch die Bildungsraten an Tritiumwasser lagen bei beiden Versuchsreihen nur in der Größenordnung des Blindwertes (III.1.). Mit ca. 2 Mol% lagen auch die Ergebnisse der Bestimmung der Konzentration an alkylierenden Metaboliten auffällig niedrig.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit experimentellen Tumoren deuten darauf hin, daß neben der im Vergleich zum soliden Yoshida-Sarkom geringen Radiosensibilität des Ehrlich-Ascites dieser auch gegen alkylierende Zytostatika wie Endoxan relativ unempfindlich ist.

III. 5. Inkubation von Vollblut, Serum und Erythrozyten mit Endoxan

Die bisher beschriebenen Ergebnisse unserer Untersuchungen stehen in einem gewissen Widerspruch zu den Befunden anderer Autoren (siehe Einleitung), wonach die Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan vorrangig in der Leber durch organspezifische Enzym-Systeme erfolgen soll. Unter Ausschaltung der Möglichkeit, daß es sich um strukturgebundene Enzym-Systeme handelt, die für die Aktivierung des Medikaments verantwortlich sind, war zu erwarten, daß eine Aktivierung und Metabolisierung von Endoxan auch in Vollblut und Serum stattfinden müßte. Wir inkubierten daher jeweils 1,0 ml Serum, 1,0 g gewaschene Erythrozyten und 1,0 ml Vakuumdialysat von hämolysiertem Vollblut in 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung mit einer Konzentration an ^{3}H-Endoxan von 2,0 mg bei einer spezifischen Aktivität von 15 µCi ^{3}H/mg. Es wurden jeweils zwei Versuchsreihen mit je drei Parallelen angesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind den Tabellen 1 und 6 zu entnehmen.

Die Bildungsraten an Tritiumwasser für Serum lagen mit ca. 5,49 % deutlich höher als für Erythrozyten (ca. 2,17 %),

während im Vollblutdialysat keine den Blindwert überschreitende Bildungsrate an ^3H_2O festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu diesen Abbauraten zu Stoffwechselendprodukten zeigt sich bei allen drei Ansätzen eine etwa gleiche Metabolisierungsrate von 1 bis 3 % (vergl. Tab. 1, Anhang). In den Radiochromatogrammen aller drei Ansätze zeigten sich die Metabolite mit den R_f-Werten 0,88, 0,5 und 0,2 im polaren Laufmittelsystem I und die unpolaren Metabolite mit den R_f-Werten 0,7 und 0,2 im Laufmittelsystem II. Bei der Serum- und Erythrozyten-Inkubation zeigten sich noch der polare Metabolit mit dem R_f-Wert 0,74 und der unpolare Metabolit mit dem R_f-Wert 0,6. Die polaren Metabolite R_f 0,6 und 0,35 zeigten sich auch in sehr geringen Anteilen in den Chromatogrammen der Inkubationslösungen nach Bebrütung mit Serum und Erythrozyten (vergl. Tab.6 , Anhang).

Die Konzentrationen an alkylierenden Metaboliten lagen bei allen drei Versuchsreihen in den Konzentraten der Dialysate in gleichen Größenordnungen von etwa 5,5 Mol% bei Serum und Erythrozyten und 4,25 Mol% bei Vollblutdialysat. Im NBP-Sprühtest zeigte der polare Metabolit mit dem R_f-Wert 0,88 positive Reaktion, während die polaren Metabolite R_f 0,74 und 0,6 nur bei der Bebrütung mit Erythrozyten ebenfalls positiv im Sprühtest reagierten.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen lassen, abgesehen von der relativ hohen Bildungsrate an Tritiumwasser im Serum, nicht darauf schliessen, daß metabolisierende Enzymsysteme auf dem Blutwege transportiert werden.Da im Vakuumdialysat des Vollbluts nur Moleküle mit einem Mol-Gewicht < 1000 vorlagen, kommen hier nur Enzyme, welche vermutlich kein Protein als Co-Faktor besitzen, in Frage.

III. 6. Inkubation von Organextrakten mit Endoxan

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit Vollblutdialysat ließen den Schluß zu, daß bei der Metabolisierung von Endoxan niedrig-molekulare Enzymsysteme zur Wirkung kommen. Wir sahen uns daher veranlaßt, in unsere Untersuchungen ebenfalls Extrakte von Organhomogenaten nach Deproteinisierung durch Vakuumdialyse mit einzubeziehen.

Jeweils 3 g Homogenat der Organe Leber, Lunge, Milz und Nieren wurden zweimal mit je 8,0 ml entsalztem H_2O extrahiert. Diese Extrakte wurden durch Vakuumdialyse deproteinisiert. In zwei Versuchsreihen mit je 5 Parallelen inkubierten wir 1,0 ml der Dialysate mit 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung, in der 2,0 mg ^{3}H-Endoxan mit einer spezifischen Aktivität von 15 µCi ^{3}H/mg gelöst waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind den Tabellen 1 und 7 im Anhang zu entnehmen.

Die durch Zusatz der Dialysate der Organextrakte gebildeten Mengen an Tritiumwasser lagen nur bei Leber deutlich über dem Blindwert (3,39 %), während sonst nur noch bei Milz eine sehr geringe Bildungsrate festzustellen war (0,37 %). Dies weist daraufhin, daß nur im Leberextrakt eine Enzymaktivität für den Abbau des Endoxans zu Stoffwechselendprodukten vorzuliegen scheint. Bei allen dialysierten Organextrakten war keine Metabolisierungsrate nachzuweisen, welche über dem Blindwert lag. Die quantitative Bestimmung der direkt alkylierenden Metabolite zeigte in etwa gleiche Tendenz wie die Bildungsraten an Tritiumwasser. So fanden wir im Organextrakt der Leber 6,28 Mol%, der Lunge 4,19 Mol%, der Milz 4,24 Mol% und der Nieren 1,04 Mol% an NBP-reaktiven Metaboliten des Endoxans (vergl. Tab. 1).

Im Radiochromatogramm fanden sich vorwiegend polare Metabolite im Laufmittelsystem I mit den R_f-Werten 0,88, 0,74 und 0,6 (alle drei Metabolite zeigten NBP-positive Reaktion im Sprühtest), 0,5, 0,35 und 0,2 (vergl. Tab. 7).

Entsprechend den Ergebnissen des Inkubationsversuches mit Vollblutdialysat zeigten auch die Dialysate von Organextrakten eine geringere Stoffwechselaktivität im Hinblick auf die Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan. Allerdings zeigten sich hierbei deutliche Unterschiede in der Umsatzleistung der verschiedenen Organe, die bei der Inkubation von Organhomogenaten und -schnitten bei deutlich höheren Metabolisierungsraten nicht beobachtet werden konnten.

III.7. Inkubation von biologisch inaktivem bzw. inaktiviertem Material mit Endoxan

Die in Kapitel III.6. beschriebenen Untersuchungsergebnisse gaben einen Anhalt dafür, daß niedrig molekulare Systeme zu oxydativen Angriffen auf das Endoxan-Molekül und zu der Bildung von alkylierenden Substanzen in der Lage sind. Eine Komplementärbindung dieser niedrig molekularen Enzyme mit Proteinen kann ausgeschlossen werden. Den Nachweis, daß es sich bei diesen oxydativen Aktivatoren des Endoxan-Moleküls um biogene Substanzen handelt, versuchten wir durch Inkubation von Endoxan mit biologisch inaktiven bzw. inaktivierten Substanzen zu führen.

Wir inkubierten 200 mg Leberhomogenat, das 30 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert worden war, in 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung mit 2 mg Endoxan (2 Versuche mit je 3 Parallelen). In den Chromatogrammen der durch Vakuumdialyse deproteinisierten Inkubationslösungen konnten wir mit Hilfe des NBP-Sprühtestes im polaren Chromatographiesystem I die positiv reagierenden Metabolite R_f 0,88 , 0,74 und 0,6 nachweisen. Dieser Nachweis einer Aktivierung des Endoxans durch Inkubation mit inaktiviertem Leberhomogenat führte zu entsprechenden Untersuchungen mit Urin, um zu prüfen, ob auch hier eine Metabolisierung des Endoxans möglich war.

2 mg ^{3}H-Endoxan mit einer spezifischen Aktivität von 15 µCi ^{3}H/mg wurden jeweils mit 2 ml menschlichem Urin und 2 ml dialysiertem Urin inkubiert (2 Versuchsreihen mit je 2 Parallelen)

Wir stellten weder eine Tritiumwasserbildung, noch eine den Blindwert überschreitende Metabolisierung fest. Als Metabolite mit alkylierender Potenz wurden im polaren Laufmittelsystem I die mit den R_f-Werten 0,88 , 0,74 und 0,6 nur im Urindialysat gefunden und in beiden Versuchsreihen der unpolare Metabolit R_f 0,7 im unpolaren Laufmittelsystem II. Im quantitativen NBP-Test zeigte sich eine Konzentration an direkt alkylierenden Metaboliten im Urin von 3,42 Mol% und im Urindialysat von 2,02 Mol%.

Mit 2 ml abgekochtem menschlichem Urin bzw. Urindialysat (Kochzeit 30 Minuten) führten wir Inkubationsversuche mit 0,2 mg nicht radioaktiv-markiertem Endoxan in Warburg-Ringer-Lösung durch. Qualitative und quantitative Untersuchungen mit dem NBP-Test führten zu folgenden Ergebnissen.

An direkt alkylierenden Metaboliten wurden im Laufmittelsystem I der mit einem R_f-Wert von 0,74 und im Laufmittelsystem II der mit dem R_f-Wert 0,7 ermittelt. Im abgekochten Urin lag die Konzentration an alkylierenden Metaboliten bei 2,68 Mol% und im entsprechenden Dialysat bei 2,02 Mol%.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihen zeigten eindeutig, daß die Bildung von Substanzen mit alkylierender Potenz nicht ausschließlich auf biologisch aktive Enzymsysteme zurückgeführt werden kann. Es stellte sich uns die Frage nach Art und Qualität dieser vermutlich anorganischen oxydativen Reaktionsmechanismen. Über die Ergebnisse der zu diesem Fragenkomplex durchgeführten Untersuchungen wird im folgenden Kapitel berichtet.

III.8. Untersuchungen über die Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan durch anorganische Katalysatoren

Es mußte in Betracht gezogen werden, daß durch Valenzwechsel einiger in verschiedenen Wertigkeitsstufen auftretender Spurenmetalle in Verbindung mit der Elektronenaffinität des energiereichen Endoxanmoleküls in Abhängigkeit vom pH-Wert und Redox-Potential in wässrigen Medien eine katalytische Oxydation und damit Metabolisierung des Endoxans bewirkt werden kann. Wir überprüften diese Möglichkeit, indem wir Endoxan in Warburg-Ringer-Lösung mit physiologischen Konzentrationen an einzelnen Spurenmetallen und Gemischen von Salzen dieser Metalle inkubierten. 0,25 mg ^{3}H-Endoxan mit einer spezifischen Aktivität von 120/uCi ^{3}H/mg in 5,1 ml Warburg-Ringer-Lösung wurden unter Zusatz folgender Mengen an Schwermetallsalzen inkubiert (jeweils 3 parallele Versuchsansätze).

1. 200/ug $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (= 0,099/ug Cu/ml Inkubationslösung).
2. 200/ug $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (= 0,079/ug Fe/ml Inkubationslösung).
3. 200/ug $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (= 0,108/ug Mn/ml Inkubationslösung).

Weitere Inkubationsversuche wurden mit je 3 Parallelen mit den Metallsalzgemischen von 1. und 2., 1. und 3. sowie 2. und 3. durchgeführt.

Die Untersuchungen mit den einzelnen Metallsalzen sowie den Kombinationen der Salze von Kupfer und Mangan sowie von Eisen und Mangan zeigten nur sehr geringe Umsatzraten, die maximal 1-2fach höher als der parallel laufende Blindwert lagen. Ein Nachweis von Tritiumwasser wie auch von NBP-aktiven Metaboliten war nicht zu erbringen. Die Kombination von Kupfer und Eisensalz zeigte jedoch eine deutliche Metabolisierung und Aktivierung des eingesetzten Endoxans. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind den Tabellen 1 und 8 zu entnehmen. Während die Bildungsrate an Tritiumwasser den Blindwert nicht überschritt, war die Metabolisierungsrate mit 4,18 % deutlich meßbar. Die im Radiochromatogramm nachweisbaren Metabolite

mit den R_f-Werten 0,88 , 0,74 und 0,6 im Laufmittelsystem I und der Metabolit mit dem R_f-Wert 0,7 im Laufmittelsystem II zeigten im NBP-Sprühtest positive Reaktion. An nicht direkt alkylierenden Metaboliten wurden im polaren Chromatographiesystem I noch die Metabolite mit den R_f-Werten 0,5 und 0,35 nachgewiesen. Im quantitativen NBP-Test bestimmten wir die Konzentration an direkt alkylierenden Metaboliten zu 9,33 Mol%.

Diese Ergebnisse deuten möglicherweise darauf hin, daß eine Beteiligung der ionogenen Mikroelemente an der Metabolisierung und Aktivierung des Endoxans durch katalytische Oxydation nicht ausgeschlossen werden darf.

IV. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse und Diskussion

Nach BROCK und HOHORST (2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15) wird Endoxan in der Leber des Warmblüters durch mischfunktionelle, mikrosomale Enzymsysteme oxydativ in cytostatisch aktive Produkte umgewandelt. Diese Aktivierung beruht vermutlich nicht auf einer O-, sondern auf einer N-Dealkylierung, wobei direkt wirkende Metabolite und ihre Vorläufer durch oxydative Reaktionskinetik am C_4-Atom des Phosphamidringes entstehen. Es wird sowohl eine ringoffene Form dieser Metabolite (Carboxyl-Gruppe) als auch eine ringgeschlossene Oxidationsform des Endoxans diskutiert. Dieser der Leber zugeschriebene Umwandlungsprozeß der Transportform (Endoxan) in cytostatischen Wirkformen soll vorwiegend zu zwei aktiven Metaboliten führen, die in einem polaren Chromatographiesystem durch ihre charakteristischen R_f-Werte identifiziert werden können. Die von SONNEBORN (37) beschriebene Struktur eines dieser Metaboliten wurde von BAKKE und Mitarbeitern(45, 46) bei Analysen im Urin des Schafes nach Endoxan-Applikation bestätigt. Ein Beweis dieser Struktur steht jedoch insofern noch aus, als bisher die synthetische Darstellung dieses Metaboliten nicht gelungen ist. Die cytotoxische Wirkung dieser aktiven Metabolite im Tumor wie auch in den kritischen Organen setzt somit den Transport dieser aktivierten Metabolite als auch ihrer eventuellen Vorläufer von der Leber als dem Entstehungsort in die Zellen der Gewebe und damit auch des Tumors auf dem Blutwege voraus.

In tierexperimentellen Studien wurde von SCHAUMLÖFFEL und Mitarbeitern (16, 18, 40) in den ersten Stunden nach Applikation hoher Endoxan-Dosen (Stoßtherapie) in mehreren analysierten Organen und experimentellen Tumoren gleiche zeitliche Maxima sowohl an Endoxan als auch an biologisch aktiven Metaboliten nachgewiesen, wobei sich für Endoxan wie auch für die NBP-reaktiven Metabolite deutliche Anreicherungsfaktoren gegenüber dem Serum bzw. Vollblut ergaben. Bei der Analyse der Ausscheidungen zeigte sich eine rasche renale Elimination dieser biologisch aktiven Stoffe. Diese Befunde deuteten darauf hin, daß neben

der Leber auch andere Organe befähigt sein müßten, Endoxan zu metabolisieren und zu aktivieren. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen und ihre Ergebnisse sollten zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

Bei vergleichbarer Inkubationstechnik, wie sie vom Arbeitskreis BROCK et al. (9,13,14) angewendet wurde, erweiterten wir die Analytik und damit die Aussagekraft unserer Untersuchungsergebnisse durch den Einsatz von Endoxan, das in der Lost-Gruppe mit Tritium radioaktiv markiert worden war. Wir konnten so über die Bildungsrate an Tritiumwasser eine Aussage über den Abbau von Endoxan bzw. nach extracyclischer N-P-Spaltung von NH-Lost zu Stoffwechselendprodukten machen und durch radiochromatographische Analyse den Umbau des Endoxans in Metabolite, die durch ihre R_f-Werte charakterisiert sind, ermitteln. Neben diesen radiochemischen Analysen führten wir parallel zu BROCK et al. (3,9,10,13) in den Inkubationslösungen die Bestimmung von alkylierenden Metaboliten mit Hilfe des NBP-Testes über die photometrische Bestimmung der Farbreaktion durch. Eine mögliche Beeinflussung der Struktur durch die Oxydationswirkung der Perchlorsäure bei der Proteinfällung in den Inkubationslösungen und die starken pH-Verschiebungen durch die erforderliche Neutralisation mit KOH und die dabei unvermeidlichen Mitfällungseffekte auf freie Metabolite sowie die Volumenvergrößerung bzw. Konzentrationserniedrigung um mindestens den Faktor 2 schlossen wir im Gegensatz zu BROCK et al. (8,9,14) aus durch schonende Deproteinisierung mittels Vakuumdialyse. Durch die Vereinigung möglichst großer aliquoter Teile von Inkubationslösungen paralleler Ansätze (n = 15) und deren Einengung, d.h. Erhöhung der spezifischen Konzentration an Metaboliten mit alkylierender Potenz durch Gefriertrocknung konnten wir die Analysen in optimalen Konzentrationen für den Nachweis NBP-reaktiver Metabolite durchführen.

In unseren Untersuchungen zogen wir sowohl Schnitte als auch Homogenate der Rattenorgane bzw. -gewebe

Leber, Lunge, Milz, Nieren, Skelettmuskel und solides Yoshida-Sarkom sowie Knochensplitter (Femur) ein. Weiter wurde in entsprechenden Inkubationsversuchen die Metabolisierung von Endoxan durch intakte und homogenisierte Asciteszellen der Maus, Knochenmark und -dialysat des Rindes, Serum, Erythrozyten und Vollblut-Dialysat sowie wässrige Extrakte der Organhomogenate von Leber, Lunge, Milz und Nieren analysiert. Schwermetalle, die in mehreren Oxydationsstufen auftreten können und deren Gemische wurden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen.

Tritiumwasser-Bildungsraten bei der Inkubation von Endoxan-^{3}H mit Organschnitten und -homogenaten der Ratte liegen zwischen 5 und 10 %, wobei die Tendenz einer höheren Bildungsrate bei Homogenaten gegenüber Schnitten deutlich wird. Die Unterschiede sowohl zwischen Organen als auch zwischen Schnitten und Homogenaten sind auf Grund der Streuungen der Mittelwerte biologisch nicht signifikant. Auffällig ist, daß auch bei Knochensplittern, Knochenmark und -dialysat auffällig hohe Tritiumwasserbildungsraten vorliegen, während in Serum und Erythrozyten deutlich niedrigere Werte auftreten (vergl. Tab. 1). Bei der Bebrütung der Extrakte der Organe Leber, Lunge, Milz und Nieren sowie bei Vollblutdialysat war abgesehen vom Leberextrakt eine Tritiumwasserbildung nicht nachweisbar. Hieraus kann abgeleitet werden, daß der Abbau zu Stoffwechselendprodukten strukturgebundenen Enzymsystemen unterliegt. Dies gilt auch für den Versuch, mit einem Schwermetallgemisch (Cu/Fe), das bei deutlicher Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan keine Entstehung von Tritiumwasser aufzeigte.

Entsprechend der relativ hohen Fehler der Mittelwerte sind die Unterschiede in der Metabolisierungsrate sowohl zwischen den einzelnen Organen als auch zwischen Organschnitten und -homogenaten als zufällig zu werten. Diese chromatographisch nachgewiesene Metabolisierungsrate, die zwischen 2 % (Milz) und 15 % (Niere) liegt, zeigt bei der Leber mit Mittelwerten von 3,5 %(Schnitte)

bzw. 5,7 % (Homogenate) keine höheren Ergebniswerte als bei allen anderen analysierten Organen bzw. Geweben. Eine auffällig hohe Rate zeigen auch hier Knochensplitter (7 %) und Knochenmark (10 %) sowie das solide Yoshida-Sarkom (9 %). Bei Ehrlich Ascites der Maus zeigte sich hingegen keine meßbare Metabolisierung. Ist bei Serum, Erythrozyten und Vollblutdialysat noch eine geringe Metabolisierungsrate festzustellen, so zeigten die deproteinisierten Organextrakte keine über den Blindwert liegende Umwandlung des Endoxans. Das Gemisch aus Kupfer-Eisensalzen zeigt dagegen eine mittlere Metabolisierungsrate von etwa 4 % und ist somit den Umsatzraten der Organe und Gewebe vergleichbar. Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe deuten ebenfalls daraufhin, daß es sich bei der Metabolisierung des Endoxans um Enzymsysteme höheren Molekulargewichts handeln muß, wobei eine strukturgebundene Wirksamkeit nicht ausgeschlossen werden kann. Es muß jedoch daraufhingewiesen werden, daß beim Homogenisieren (Ultraturax) intakte Zellstrukturen nicht mehr vorliegen dürften.

An NBP-reaktiven Substanzen fanden sich bei allen analysierten Organen und Geweben sowohl bei Schnitten als auch bei Homogenaten keine auffälligen Unterschiede. Die mittlere Umsatzrate zu NBP-aktiven, d.h. zu alkylierenden Metaboliten ergab sich zu etwa 10 %. Die höchste NBP-Aktivität zeigt das solide Yoshida-Sarkom mit 14 %, während im Gegensatz hierzu Ascites der Maus mit nur 2 % vernachlässigbar niedrig liegt. Auch das Kupfer-Eisensalzgemisch liegt mit etwa 10 % NBP-Aktivität auffällig hoch. Bei einer Aktivierungsrate von Serum, Erythrozyten und Vollblutdialysat von etwa 5 % zeigen erstaunlicherweise auch die Dialysate der Organextrakte nachweisbare Aktivierungsraten, die bei Leber mit 6 % am höchsten und bei Niere mit 1 % am niedrigsten liegen.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen läßt sich nicht ableiten, daß die Leber eine zentrale Stellung in der Metabolisierung und Aktivierung des Endoxans einnimmt, sondern daß vielmehr alle von uns analysierten Organe in der Lage sein dürften, die oxydativen Abbauprozesse im Endoxan-Stoffwechsel durchzuführen. Auch SONNEBORN (37) weist darauf hin, daß neben der Leber auch Lunge, Milz und Nieren in der Lage sein sollen, Endoxan zu cytostatisch aktiven Metaboliten umzuwandeln.

Die Unterschiede in der Untersuchungsreihe mit den beiden experimentellen Tumoren (solides Yoshida-Sarkom der Ratte, Ehrlich-Ascites der Maus) zeigen eine interessante Übereinstimmung mit der chemotherapeutischen Empfindlichkeit dieser Neoplasmen gegenüber Endoxan. Hieraus könnte geschlossen werden, daß resistente Tumoren eventuell auf Grund eines veränderten Redox Potentials nicht zum Abbau, d.h. zur Aktivierung von Endoxan befähigt sind. Daß solche Prozesse eine Rolle spielen können, wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen mit einem Schwermetallgemisch deutlich, wobei sich eine gewisse Ähnlichkeit mit der Reaktionskinetik des UDENFRIEND-Modell ergibt. Einzel-Metallsalze waren im Gegensatz zu dem erwähnten Gemisch nicht in der Lage, Endoxan zu metabolisieren bzw. zu aktivieren.

In diesen Untersuchungen fällt eine gewisse Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Metabolisierungsrate mit Hilfe der Radio-Dünnschichtchromatographie und der Aktivierungsrate, die nach dem NBP-Test ermittelt wurde, auf. Die gegenüber der radiochemisch ermittelten Metabolisierungsrate um den Faktor 1,5 bis 2 höhere Alkylierungsrate kann nicht nur durch analytische Fehlermöglichkeiten erklärt werden, sondern beruht auf der erforderlichen Korrektur der chromatographischen Analyse durch Abzug der im Blindwert nachgewiesenen prozentualen Verluste an verändertem Endoxan-^{3}H, was vorwiegend auf Radiolyseprodukte zurückzuführen ist. Bei Auswertung der Radio-Dünnschichtchromatogramme ohne diese erwähnte Korrektur (vergl. Tab. 2 - 8) läßt sich eine auffällig gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen

des NBP-Testes und der Summe der im NBP-Sprühtest positiv reagierenden und radiochemisch quantitativ bestimmten Metabolite (polar R_f 0,88, 0,74 und 0,6; unpolar R_f 0,7) feststellen. Es muß daher angenommen werden, daß Radiolyseprodukte des Endoxans entweder alkylierende Potenz besitzen oder aber unter der Bebrütung aktiviert wurden. Unsere Ergebnisse mit dem NBP-Test zeigen jedoch auch Unterschiede zu den Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Dies liegt vermutlich, wie bereits erwähnt, an der unterschiedlichen Aufbereitung des Probenmaterials. Weiterhin muß erwähnt werden, daß die photometrische Bestimmung der Farbreaktion von NBP-Reagenz mit alkylierenden Stoffen mit großen Schwierigkeiten verbunden ist, da diese Farbe ausserordentlich rasch verblaßt. Eine Beeinflussung der Extinktionswerte durch eine gewisse Wasseraufnahme der organischen Phase kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. (Diese NBP-Bestimmung ist in ihrer Ungenauigkeit vergleichbar mit der heute nicht mehr angewendeten Hämoglobin-Bestimmung als salzsaures Hämatin nach SAHLI).

Unsere Ergebnisse stehen in einem nicht unerheblichen Gegensatz zu den Befunden von BROCK u. HOHORST bei im weitesten Sinne vergleichbarer Methodik in der Anwendung des NBP-Testes. Da wir jedoch nach beiden angewendeten Verfahren, d. h. sowohl nach der radiochemischen Analyse als auch nach photometrischer Bestimmung der alkylierenden Substanzen weitgehende Übereinstimmung fanden, dürften unsere Ergebnisse unter Berücksichtigung der Verhältnisse der angewendeten Methodik als repräsentativ anzusehen sein. Für die Klinik ergibt sich hieraus ein neuer Gesichtspunkt, der weniger die Stoffwechselleistung der Leber als vielmehr die Permeation des Medikaments in die neoplastischen Gewebe und deren Fähigkeit zur Umwandlung in cytostatisch aktive Metabolite zum Inhalt hat. Die erwähnten hydrophilen Metabolite mit alkylierender Potenz, die heute vorwiegend als die eigentlich cytostatisch aktiven Substanzen angesehen werden, können nach u.A. auch nur potentielle Vorläufer von biologisch wirksamen Substanzen sein. Da anzunehmen ist, daß

die aktuellen Akylantien des Endoxan-Metabolismus eine ausgesprochen kurze Halbwertszeit besitzen, konnten sie selbstverständlich in unserer Analytik nicht erfaßt werden. Die positive Reaktion dieser Stoffe im NBP-Sprühtest kann kein Anhaltspunkt dafür sein, daß diese Stoffe aktuelle Alkylantien und damit die eigentlichen biologisch wirksamen Stoffe sind, da auch potentielle Vorläufer unter den methodischen Bedingungen aktiviert werden können. Selbstverständlich ist eine Übertragung unserer in-vitro-Bedingungen auf die Verhältnisse in vivo nur mit entsprechenden Vorbehalten möglich.

V. Zusammenfassung

In in-vitro-Inkubationsversuchen untersuchten wir die Fähigkeit verschiedener Organe und Gewebe der Ratte das biologisch inaktive Endoxan-Molekül zu metabolisieren und in cytostatisch aktive Stoffe umzuwandeln. Schnitte und Homogenate verschiedener Organe der Ratte (200 mg) sowie experimentelle Tumoren, Knochensplitter, Knochenmark, Serum, Erythrozyten, Dialysate von Vollblut und Organextrakten sowie Schwermetallsalze und ihre Gemische wurden über 90 Minuten bei 37° C in einer Warburg-Apparatur in 5,1 ml einer modifizierten Warburg-Ringer-Lösung unter Zusatz von Endoxan (50 µg - 2 mg), das in der Lost-Gruppe mit Tritium markiert worden war, in parallelen Versuchsansätzen (n = 15) inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Inkubationslösungen durch Vakuumdialyse deproteinisiert. In diesen Dialysaten bestimmten wir die Bildungsrate an Tritiumwasser als Größe für den Abbau des Gesamtmoleküls bzw. der N-Lost-Gruppe zu Stoffwechselendprodukten, radiodünnschicht-chromatographisch den Anteil an unverändertem Endoxan und an über ihre R_f-Werte charakterisierten Metaboliten, wobei mit Hilfe des NBP-Sprühtests die Metabolite mit alkylierender Potenz identifiziert wurden. Die Radioaktivitätsbestimmungen erfolgten mit Hilfe der Flüssigszintillationsspektrometrie. Aliquote Teile der parallel angesetzten Inkubationslösungen wurden vereinigt und durch Gefriertrocknung auf optimale Konzentrationen zur Bestimmung der Konzentration an alkylierenden Metaboliten über die photometrische Bestimmung der Farbreaktion mit γ-(4-Nitrobenzyl)-Pyridin (NBP) eingeengt. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Homogenate und Schnitte der Rattenorgane Leber, Lunge, Milz, Nieren und Skelettmuskel wiesen einen Abbau zu Stoffwechselendprodukten in Höhe von 6 - 10 % des eingesetzten Endoxans auf. Unterschiede zwischen den Organen und zwischen Schnitten und Homogenaten waren statistisch nicht abzusichern. Die Metabolisierungsrate des eingesetzten Endoxans lag zwischen 2 % (Milz) und 13 % (Nieren), wobei Homogenate eine deutlich

höhere Metabolisierungsrate aufwiesen als Schnitte. An NBP-reaktiven Substanzen mit alkylierender Potenz zeigten sowohl Schnitte als auch Homogenate aller analysierten Organe Werte, die im Mittel 10 % aufwiesen, ohne erkennbare unterschiedliche Tendenzen bei einzelnen Organen.

2. Knochensplitter (Ratte) zeigten bei 10 % Bildungsrate an ^3H_2O eine Metabolisierungsgröße von etwa 7 % und eine NBP-Reaktivität von 11 %. Bei Knochenmark und -dialysat (Rind) konnten wir etwa 5 % ^3H_2O-Bildung und eine NBP positive Reaktion von 9 bzw. 8 % bezogen auf das eingesetzte Endoxan nachweisen. Die Metabolisierungsrate lag bei Dialysat unter der Größe des Blindwertes, während bei Knochenmark 10 % Metabolisierungsrate gemessen wurde.

3. Zeigte das solide Yoshida-Sarkom der Ratte sowohl bei der Inkubation von Schnitten als auch bei der von Homogenaten mit einer ^3H_2O-Bildung von 10 %, einer Metabolisierung von 8 bzw. 10 % und einer Endoxan aequimolaren Konzentration an alkylierenden Metaboliten von etwa 14 % ausgesprochen hohe Werte, so wiesen unter gleichen Versuchsbedingungen intakte Ascites-Zellen wie auch Homogenat weder eine ^3H_2O-Bildungsrate noch eine Metabolisierungsrate auf und lagen mit etwa 2 % NBP-reaktiver Stoffe auffällig niedrig. Das Verhalten beider Tumorarten entspricht ihrer Sensibilität in der Chemotherapie mit Endoxan.
4. Bei Serum und Erythrozyten-Bebrütung konnten 5 bzw. 2 % ^3H_2O, 1 bzw. 3 % Metabolisierung und 4 bzw. 5 % NBP-Reaktivität nachgewiesen werden. Vollblut-Dialysat zeigte bei einer Metabolisierungsrate von etwa 1 % kein ^3H_2O, jedoch eine Konzentration an Metaboliten mit alkylierender Potenz von etwa 4% des eingesetzten Endoxans.

5. Die wäßrigen Extrakte der Organe Leber, Lunge, Milz und Nieren zeigten abgesehen von Leber (3 %) keine Bildungsrate an Tritiumwasser. Eine Metabolisierung von etwa 1 % war nur im Leberextrakt feststellbar. Den höchsten Anteil an alkylierenden Stoffen wies die Inkubation mit Leberextrakt (6 %), den niedrigsten die mit Nierenextrakt (1 %) auf.

6. Bei einem Kupfer-Eisen-Salzgemisch ergab sich eine Metabolisierungsrate von etwa 4 % bei 9 % NBP-reaktiven Substanzen; $^{3}H_2O$ wurde bei diesen Versuchen nicht gebildet. Schwermetalle allein wie auch andere Metall-Salz-Gemische zeigten keine meßbaren Reaktionen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Metabolisierung und Aktivierung von Endoxan nicht nur in der Leber, sondern in allen analysierten Organen abläuft. Hierbei scheint der Abbau des Moleküls zu Stoffwechselendprodukten strukturgebunden zu sein, während die Metabolisierung auch von niedrig molekularen Enzymsystemen und dem REDOX-Potential abzuhängen scheint. Bei einer mit Vorbehalt durchgeführten Übertragung der Ergebnisse auf die Verhältnisse in vivo erscheint somit der Permeation des Endoxans in die Tumorzelle und deren Stoffwechselaktivität im Hinblick auf die Aktivierung des Moleküls Vorrangigkeit gegeben zu werden müssen und weniger der Frage der Entstehung der vorwiegenden hydrophilen polaren Metabolite in der Leber und deren Transport in die Tumorzelle auf dem Blutweg. Die angewendete Methodik und die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit vorliegenden Befunden aus der Literatur diskutiert.

Tabelle 1	^3H_2O (%) A	Metabolisierung(%) B	Gesamtumsatz(%) C	NBP(%) D
Leber homogenat	7,25 ± 4,14	5,67 ± 2,51	12,92 ± 3,32	9,42
" schnitte	9,05 ± 2,85	3,43 ± 4,85	12,84 ± 3,84	11,52
Lunge hom.	7,97 ± 2,76	5,23 ± 4,00	13,20 ± 3,22	10,46
" schnitte	8,95 ± 3,86	4,58 ± 6,47	13,53 ± 5,29	11,56
Milz hom.	7,25 ± 3,42	2,35 ± 0,69	9,60 ± 2,06	9,46
" schnitte	5,76 ± 7,25	- -	5,76 ± 3,66	9,50
Niere hom.	5,96 ± 2,26	15,98 ±13,97	21,94 ± 8,11	8,36
" schnitte	9,52 ± 3,69	- ± -	9,52 ± 2,11	13,56
Muskel hom.	7,88 ± 5,94	4,13 ± 1,06	12,01 ± 3,49	10,50
" schnitte	6,72 ± 0,41	0,60 ± 0,85	7,32 ± 0,64	8,36
Knochensplitter	10,61 ± 5,66	7,45 ± 6,87	18,06 ± 6,26	11,24
Knochenmark	4,64 ± 0,26	10,18 ± 4,54	14,82 ± 2,40	9,23
"-dialysat	4,99 ± 0,56	- -	4,99 ± 0,28	7,78
Tumor hom.	10,74 ± 1,83	9,95 ± 2,14	20,69 ± 1,98	14,66
" schnitte	10,92 ± 3,98	7,97 ± 2,08	18,89 ± 3,03	13,40
Ascites	- -	- -	- -	2,14
" hom.	- -	- -	- -	2,08
Serum	5,49 ± 2,73	1,11 ± 1,73	6,60 ± 2,23	5,76
Erythrozyten	2,17 ± 0,77	3,45 ± 2,04	5,62 ± 1,40	5,24
Vollblutdialysat	- -	1,22 ± 1,68	1,22 ± 0,86	4,24
Leber extrakt	3,39 ± 1,33	- -	3,39 ± 1,69	6,28
Lunge "	- -	- -	- -	4,19
Milz "	0,37 ± 0,14	- -	0,37 ± 0,07	4,24
Niere "	- -	- -	- -	1,04
Schwermetall-gemisch	- -	4,18 ± 3,54	4,18 ± 1,88	9,33

Tab. 1 Ergebnisse der radio-chemischen und chemischen (NBP-Test) Untersuchungen über Abbaurate zu Endprodukten (^3H_2O), Metabolisierungsrate (Dunnschichtchromatographie), Gesamt Umsatzrate und Bildungsrate an alkylierenden Metaboliten bei der Inkubation verschiedener Materialien mit ^{3}H-Endoxan.

Tabellen 2 - 8 **2-Phasen Dünnschicht-Radiochromatogramme**

	Untersuchungsmaterial :	Verteilung der Gesamt-Aktivität auf R_f-Werte in % (polare Chromatographie I) 0,2	0,35	0,5	0,6	0,74	0,88	1,00	(unpolare Chromatographie II) 0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Tab.2	Organhomogenate														
	Leber	1,79	0,40	3,92	--	3,06	2,40	--	--	86,22	--	--	2,15	--	--
	Lunge	1,49	--	4,36	--	2,44	2,82	--	--	86,67	1,78	--	--	--	--
	Milz	1,59	--	3,50	--	1,71	3,33	--	--	89,55	--	--	--	--	0,28
	Niere	--	3,82	6,59	--	4,43	6,46	--	2,75	75,92	--	--	--	--	--
	Muskel	--	--	5,79	--	3,27	2,77	--	--	85,27	--	--	1,03	--	--
	Organschnitte														
	Leber	0,33	--	2,44	--	3,99	1,89	--	--	89,90	--	--	--	1,24	0,15
	Lunge	0,76	--	3,28	--	4,90	2,44	--	--	87,50	--	--	--	1,08	--
	Milz	0,26	--	1,93	--	0,50	2,54	--	--	94,05	--	--	--	--	0,31
	Niere	--	0,88	1,39	--	1,94	1,19	--	1,07	92,31	--	0,85	0,32	--	--
	Muskel	0,20	--	2,00	--	0,52	2,77	--	0,46	91,86	--	--	--	1,87	--
	Knochen	1,65	--	4,33	--	2,55	3,65	--	0,65	84,45	--	2,68	--	--	--
Tab.3	Knochenmark	0,54	2,09	--	3,10	2,56	1,49	--	3,01	81,72	--	--	4,83	--	--
	Markdialysat	0,35	1,02	--	1,18	2,06	--	--	--	91,68	--	--	3,72		
Tab.4	Tumorhomogenat	0,07	5,56	--	--	2,45	5,32	--	--	81,95	--	3,29	--	--	--
	Tumorschnitte	1,23	5,95	--	--	1,52	5,67	--	--	83,93	--	--	1,66	--	--
Tab.5	Ascites	--	2,24	--	--	1,68	2,34	--	--	93,72	--	--	--	--	--
	Asc.homogenat	--	0,88	--	--	1,09	3,02	--	--	94,98	--	--	--	--	--
Tab.6	Serum	0,50	0,34	3,12	--	0,27	3,26	--	0,68	90,79	--	0,78	0,21	--	--
	Erythrocyten	0,43	--	2,88	0,50	0,93	3,95	--	0,77	89,45	--	0,79	0,25	--	--
	Vollblut-dialysat	0,64	--	3,03	--	--	3,88	--	0,64	90,68	0,85	--	0,23	--	--
Tab.7	Organdialysate														
	Leber	1,07	1,07	1,93	1,06	1,53	1,13	--	1,70	90,47	--	--	--	--	--
	Lunge	--	2,25	2,00	0,68	1,59	1,23	--	--	92,21	--	--	--	--	--
	Milz	1,48	0,40	1,75	1,09	1,24	1,08	0,73	--	92,18	--	--	--	--	--
	Niere	1,18	1,30	2,55	1,10	1,68	1,86	--	0,92	88,73	--	--	--	--	--
Tab.8	Schwermetalle	--	1,14	1,17	1,04	1,05	2,37	--	--	87,72	--	--	5,47	--	--

Die Metabolite mit direkt alkylierender Potenz (NBP-Sprühtest) sind in den Tabellen unterstrichen !

1. ARNOLD, H., BOURSEAUX, F. — Synthese des N,N-Bis-(2-chlorathyl)-O-(3-aminoprophyl)-phosphorsäure-amidesters
Arzneim. Forsch. 13 (1963) 927

2. BROCK, N. — Experimentelle Grundlagen der Chemotherapie des Krebses
Arzneim. Forsch. 7 (1957) 727 - 735

3. BROCK, N. — Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebschemotherapeutica
Arzneim. Forsch. 8 (1958) 1 - 9

4. BROCK, N. — Neue experimentelle Ergebnisse mit N-Lost-Phosphamidestern
Krebsforsch. u. Krebsbekämpfung, Band III (Urban % Schwarzenberg) Sonderbände zur Strahlentherapie Bd. 41 (347 - 354)

5. BROCK, N. — Zur Frage der selektiven Tumorwirkung von Endoxan
Med. z. Hyg. XVII (1959) 480

6. BROCK, N., HOHORST, H.-J. — Zur Frage der Knochenmarkschädigung durch cancerotoxische Substanzen
Klin. Wschr. 2 (1960) 69 - 71

7. BROCK, N. WILMANNS, H. — Pharmakologische Grundlagen der Chemotherapie des Krebses
Die Therapiewoche 10 (1960) 12 : 5 - 15

8. BROCK, N., HOHORST, H.-J. — Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus
Naturwiss. 49 (1962) 610 - 611

9. BROCK, N., HOHORST, H.-J. — Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro
Arzneim. Forsch. 13 (1963) 1021 - 1031

10. BROCK, N., HOHORST, H.-J. — Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Endoxan
III. Int. Kongr. Chemother. 22-27. 7. 1963 Stuttgart, Verhandl. Band II (Thieme-Verlag) 1089 - 1091

11. BROCK, N. — Vorklinische Studien zur Charakterisierung neuer Zytostatika im Tierversuch
Acta Un. Int. Cancer 20 (1924) 45 - 47

12. BROCK, N. — Fortschritte und Probleme bei der Entwicklung von Cytostatika
Ther. Woche 14 (1964) 1041 - 1046

13. BROCK, N. — Pharmakologische Charakterisierung von Cyclophosphamid und Cyclophosphamid-Metaboliten
Canz. Chemother. Rep. 51 (1967) 315 - 325

14. BROCK, N., "Metabolismus von Cyclophosphamid" Cancer 20 (1967) 900-904

15. BROCK, H., GROSS, R., HOHORST, H.-J., KLEIN, H.O., SCHNEIDER, B. "Activation of Cyclophosphamide in man and animals" Cancer 27 (1970) 1512-1529

16. GRAUL, E.H., SCHAUMLÖFFEL, H., WILMANNS, H. "Untersuchungen mit ^{14}C- bzw. ^{3}H-markiertem Endoxan" III. Int.Kongr. Chemother.22-27.7.1963

17. GRAUL, E.H. SCHAUMLÖFFEL, E., HUNDESHAGEN, H., WILMANNS, H., SIMON, G. "Metabolismus radioaktiven Cyclophosphamids, Tierversuche und klinische Studien" Cancer 20 (1967) 896 - 899

18. GRAUL, E.H. "Radiotracer-Untersuchungen bei pharmakokinetischen Studien mit Cyclophosphamid" Dtsch. Ärzteblatt 66 (1969) 1739 - 1743

19. GRUNICKE, H., LIERSCH, M., HOLZER, H., ARNOLD, H. "Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Endoxan" Biochem. Pharmac. 14 (1965) 1465 - 1490

20. HOHORST, H.-J., ZIEMANN, A., BROCK, N. "Alkylierende Substanzen in Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid" Arzneim. Forsch. 15 (1965) 432 - 434

21. HOHORST, H.-J., ZIEMANN, A., BROCK, N. "Herkunft und Spiegel von N,N-Bis-(2-chloräthyl)-amin im Serum nach Injektion von N,N-Bis-(1-chloräthyl-N^1, O-propylenphosphorsäureester-diamid" Arzneim. Forsch.16 (1966) 1529 - 1533

22. KLINKE, F., LISS, E., PALME, G. "^{3}H-Endoxan: Verteilungskinetik und DNS-Bindung" Nuc. Med.(Stuttgart) Suppl.3(1965)47-53

23. LAWLEY, P.,D. The action of alkylating agents on Deso-xyribonucleicacid in relation to biological effects of the alkylating agents. Experimental Cell Research Suppl.9(1963) 512

24. LAWLEY, P.D., BROOKES, INTERSTRAND, P. "Cross-Limbing of DNA by difunktional alkylating agents" I. Biol. 25 (1967) 143

25. LISS, E.
PALME, G.
Der Einfluß von alkylierender Cytostatika auf den Nukleinsäurestoffwechsel von Ehrlich-Aczites-Tumorzellen.
Mitteilungsdienst GBK NRW 3 (1964) 457 bis 487
Zeitschr.f.Krebsf. 66 (1964) 196-206

26. LISS, E.
KLINKE, F.
PALME, G.
Biochemische Untersuchungen über den Einfluß von Umwandlungsprodukten des Endoxans auf isolierte Aszitestumorzellen.
Zschr. f. Krebsf. 68 (1966) 73-86

27. LISS, E.
REINECKE, A.
PALME, G.
Die Hemmung der Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Synthese und die Beeinflussung der Zellvermehrung von Yoshida-Aszitestumorzellen durch alkylierende Substanzen.
Arzneimittel-Forsch.19 (1969)1137-1140

28. OEFF, K.
Pharmakokinetik und Wirkungsmechanismus alkylierender Zytostatika.
Deutscher Röntgenkongress 1966,Teil B, Strahlenbehandlung und Strahlenbiol. Sonderbd. Strahlenther.64 (1964) 234-244

29. PALME, G.
LISS, E.
WIEBEL, F.
Autoradiographische Untersuchungen über das Verhalten der Maus unter der Einwirkung von Cyclophosphamid (Endoxan).
Naturwiss. 51 (1964) 197

30. PALME, G.
LISS, E.
Wirkung alkylierender Substanzen auf den Lebenszyklus von Ehrlich-Tumorzellen, autoradiographische Studien.
Europ. I. Cancer 1 (1965) 245-251

31. PALME, G.
LISS, E.
WIEBEL, F.
Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß alkylierender Zytostatika auf den Generationszyklus normaler Wechselgewebe und Aszitestumorzellen.
Nucl.-Med.(Stuttgart) Suppl. 3 (1965) 39-45

32. RAUEN, H.M.
NORPOTH, K.
Die biologische Aktivierung von Endoxan.
Naturwiss. 52 (1965) 477

33. RITZL, F.
BOLT, W.
NAHRMANN, H.
Untersuchungen über Abbau, Verteilung und Ausscheidung von Tritium-markiertem Cyclophosphamid im menschlichen Organismus.II.Umbau des Zytostatikums in vivo.
Klin. Wschr. 40 (1962) 837-842

34. SCHAUMLÖFFEL, E.
Zur Methodik pharmakokinetischer Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Cyclophosphamid.
Atompraxis 6 (1970)

35. SCHAUMLÖFFEL, E.
GRAUL, E.H.
Radiopapierchromatographische Untersuchungen über die Verteilung von ^{3}H-Endoxan und seinen Metaboliten in verschiedenen Organen der Ratte.

36. SCHAUMLÖFFEL, E.
Vergleichende Untersuchungen über den Umsatz von ^{3}H-Endoxan an Ratte und Mensch.

37. SONNEBORN, M.
Untersuchungen zum Metabolismus von Cyclophosphamid:
Isolierung und Synthese des primären Metaboliten.
Diss. Marburg vom 14. 5. 1969

38. STEINER, B.
ARNOLD, H.
GRAUL, E.H.
BEKEL, H.
HUNDESHAGEN, H.
WILMANNS, H.
Zur Synthese von tritiummarkiertem Cyclophosphamid (einem Krebschemotherapeutikum) hoher spezifischer Aktivität.
Atompraxis 10 (1964) 358-360

39. WHEELER, G.P.
ALEXANDER, J.A.
Wirkung von Stickstoff-Lost und Cyclophosphamid auf die DNS-Synthese in vivo und in zellfreien Zubereitungen

40. WILMANNS, H.
GRAUL, E.H.
HUNDESHAGEN, H.
ARNOLD, H.
Ein Beitrag zum Problem der Tumorspezifität von Cyclophosphamid; Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen.
Cancer 20 (1964) 276-278

41. KUSCHINSKY, G.
LÜLLMANN, H.
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.

42. FRIEDMANN, O.M.
BOGER, E.
Colorimetric Estimation of Nitrogen Mustards in Ageons Media.
Anal. Chem. 33 (1961) 906

43. DRUCHEY, H.
STEINHOFF, D.
NAKAYAMA, M.
PREUSSMANN, R.
ANGER, K.
Experimentelle Beiträge zum Dosisproblem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan.
Deutsche Wschr. 13 (1963) 651-663
Deutsche Wschr. 14 (1963) 715-721

44. GRUNICKE, W.
Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus alkylierender Cytostatica. Mitteilungsdienst der Gesellschaft zur Bekämpfung der Krebskrankheiten, Nordrhein-Westfalen e.V. Heft 5 Band 5 (Dez. 1971)

45. BAKKE, J.E.
FEIL, V.J.
ZAYLSKIE, R.G.
Charakterization of the major Sheep minary Metabolites of Cyclophosphamid a defleecing chemical.
J. Ag. Foodchem. Vol. 19, Nr. 14 (1971) 788 - 790

46. BAKKE, J.E.
FEIL, V.J.
FJELSTUL, C.E.
THACKES, E.J.
Metabolism. of Cyclophosphamid by Sheep.
J.Ag. Foodchem. Vol. 20, Nr. 2 (1972) 384 - 388

L e b e n s l a u f

Am 24. 07. 1940 wurde ich als Sohn von Armand Louis van Alphen, Kapitän der Handelsmarine und seiner Ehefrau Carolina Christina, geb. Ottes, in Bandung (Ned. Ind.) geboren.

1946 - 1949	Volksschule in Den-Haag/Niederlande
1949 - 1953	Volksschule in Rotterdam/Nld
1953 - 1959	Libanon Lyceum in Rotterdam/Nld
04. 07.1959	Abitur am Libanon Lyceum
1959 - 1960	Rijksuniversiteit Leiden/Nld
1960 - 1963	School voor Fotografie & -techniek Den-Haag/Nld
Juni 1963	Abschlußexamen an der School v. Fotogr.
1963 - 1967	Leiter der Optischen Abteilung im Physikalischen Labor der Kon. Maschinefabr. Gebr. Stork & Co, n.v. in Hengelo/Ov-Niederlande
18.12. 1963	Heirat mit Karin Anna geb. Goetze aus Gladenbach
09.07. 1965	Geburt unseres Sohnes Marco
WS 1967	Beginn des zahnmedizinischen Studiums an der Philipps-Universität Marburg/Lahn
01.10. 1968	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
17.03. 1970	Zahnärztliche Vorprüfung
17.10. 1970	Geburt unserer Tochter Natascha
28.11. 1972	Zahnärztliche Prüfung

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in Marburg/Lahn:

Amon, Aurich, Bernhardt, Bommer, Dimroth, Engelhardt, Haan, Havemann, Hennis, Hering, Heuser, Hort, Janke, Karlson, Kastenholz, Keil, Koch, Koecke, Korb, Kühnel, Mahr, Mann, Mattes, Niemeyer, Nöth, Nultsch, Pantke, Petry, Pfütz, Rieken, Rohen, Rosemann, Rupec, Saalfeld, Schaumlöffel, Schiff, Schmidt, Schnell, Seidel, Siegert, Spiegelberg, Stucke, Walcher, Wendt.

Eilers-Werke, Bielefeld